

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Especialidades Clínicas Odontológicas



Máster Oficial en Ciencias Odontológicas

Trabajo de Fin de Máster

**“Comparación del Microbioma Subgingival entre
Salud/Gingivitis y Periodontitis Estadio III/IV”**

Javiera M^a Isabel Vargas Labraña

Tutor: Dra. Margarita Iniesta Albentosa

Madrid, Julio de 2020



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
VISTO BUENO DEL TUTOR
MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:	Margarita Iniesta Albentosa
---------------------	-----------------------------

del alumno/a

Nombre y apellidos	Javiera Vargas Labraña
--------------------	------------------------

encuadrado en la línea de investigación

Eficacia de intervenciones para el tratamiento de enfermedades periodontales y perimplantarias

DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Comparación del Microbioma Subgingival entre Salud/Gingivitis y Periodontitis estadio III/IV

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En _____ Madrid _____, a 27 de Junio de 2020.

Fdo: el profesor/a



El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel

MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)

CENTRO: Facultad de Odontología UCM

ESTUDIANTE DE MÁSTER: Javiera Vargas Labraña

TUTOR/ES DEL TFM: Margarita Iniesta Albentosa

TÍTULO DEL TFM:

Comparación del Microbioma Subgingival entre Salud/Gingivitis y Periodontitis estadio III/IV

FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA: Septiembre 2019

FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA (en caso de producirse):

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en Ciencias Odontológicas y su Tutor/es y en el que se fijan sus funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

2. Colaboración mutua

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

3. Normativa

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

4. Obligaciones del estudiante de Máster

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

5. Obligaciones del tutor/es del TFM

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

6. Buenas prácticas

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del

tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

8. Confidencialidad

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

9. Propiedad intelectual e industrial

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.



10. Periodo de Vigencia

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

Firmado en Madrid, a 27 de Junio de 20 20

<p>El estudiante de Máster</p>  <p>Fdo.: Javier Vargas L.</p>	<p>El Tutor/es</p> <p>INIESTA ALBENTOSA MARGARITA ISABEL - DNI 74217149J</p>  <p>Firmado digitalmente por INIESTA ALBENTOSA MARGARITA ISABEL - DNI 74217149J Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, serialNumber=IDCES-74217149J, sn=INIESTA ALBENTOSA, givenName=MARGARITA ISABEL, cn=INIESTA ALBENTOSA MARGARITA ISABEL - DNI 74217149J Fecha: 2020.06.27 11:23:12 +02'00'</p> <p>Fdo.: Margarita Iniesta Albentosa</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS



ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. Javiera Vargas Labraña
con NIF Y7469919-Q, estudiante de Máster en la Facultad de
Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el
curso 20 19 -20 20 , como autor/a del trabajo de fin de máster titulado
Comparación del Microbioma Subgingival entre Salud/Gingivitis y Periodontitis estadio III/IV

y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son:


Margarita Iniesta Albentosa

DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente.

De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 27 de Junio de 20 20


Fdo.: Javiera Vargas L.

Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.

Indice

I. Introducción	8
I. 1. Salud periodontal y periodontitis. Definición	8
I. 2. Etiología de la periodontitis	8
I. 2. 1. <i>Disbiosis</i>	9
I. 3. Análisis del microbioma	10
I. 3. 1. <i>Técnicas para el estudio del microbioma</i>	10
I. 3. 2. <i>Diversidad taxonómica</i>	11
I. 3. 3. <i>Diversidad alfa y beta</i>	11
I. 4. Microbioma oral	12
I. 5. Hipótesis	15
I. 6. Objetivo	15
II. Material y método	15
II. 1. Diseño del estudio	15
II. 2. Participantes	15
II. 3. Visitas	16
II. 3. 1. <i>Visita de selección</i>	16
II. 3. 2. <i>Visita de estudio</i>	16
II. 4. Procedimiento microbiológico	18
II. 5. Análisis estadístico	19
II. 5. 1. <i>Tamaño muestral</i>	19
II. 5. 2. <i>Análisis de los datos</i>	19
III. Resultados	20
III. 1. Características de los sujetos	20
III. 1. 1. <i>Características demográficas y hábito tabáquico</i>	20
III. 1. 2. <i>Parámetros clínicos periodontales</i>	21
III. 2. Composición taxonómica del microbioma subgingival	21
III. 3. Comparación de composición taxonómica del microbioma subgingival	21
III. 3. 1. <i>A nivel de filo</i>	22
III. 3. 2. <i>A nivel de género</i>	22
III. 3. 3. <i>A nivel de especie</i>	23
III. 4. Diversidad bacteriana	24
III. 4. 1. <i>Diversidad alfa</i>	24
IV. Discusión	25
V. Conclusión	29
VI. Anexos	29
VII. Bibliografía	34

I. Introducción

I. 1. Salud periodontal y periodontitis. Definición

La Nueva Clasificación de las Enfermedades Periodontales y Perimplantarias, establecida en el *World Workshop* de 2017 define la salud periodontal señalando que “debe basarse en la ausencia de enfermedad según lo evaluado clínicamente, asociada con gingivitis, periodontitis u otras condiciones periodontales, y puede incluir pacientes que hayan tenido antecedentes de gingivitis o periodontitis tratadas con éxito u otras condiciones periodontales, que hayan sido y son capaces de mantener su dentición sin signos de inflamación gingival clínica” (1).

Así, la salud gingival clínica puede presentarse en pacientes con periodonto intacto o reducido (pacientes sin periodontitis y pacientes con antecedentes de periodontitis que se encuentren tratados y estables). Ambos casos se caracterizan por: ausencia de sangrado al sondaje, eritema, edema y otros síntomas en el paciente. La diferencia entre un periodonto intacto y uno reducido está en que en el primer caso no existe pérdida de inserción clínica ni ósea, mientras que en el segundo estas dos características sí están presentes (1).

Por otro lado, se define la periodontitis como “una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a un biofilm dental disbiótico caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte del diente”. La periodontitis se caracteriza por una inflamación que conduce a la pérdida de tejido periodontal que incluye pérdida de inserción clínica y de hueso alveolar radiográfico, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (2).

I. 2. Etiología de la periodontitis

Hoy en día, se sugiere que la periodontitis es una infección multifactorial causada por complejos de especies bacterianas que interactúan con las células y los tejidos del huésped causando la liberación de citoquinas inflamatorias, algunas de las cuales conducen a la destrucción de los tejidos de soporte del diente. Factores del huésped tales como el estrés,

defectos inmunitarios de origen genético, tabaco y enfermedades sistémicas como la diabetes pueden contribuir en su etiología y modificar la progresión y la respuesta al tratamiento (3).

El concepto clásico simplificado de patogénesis de la periodontitis, considera que en la lesión deben estar presentes microorganismos virulentos a una dosis infecciosa mínima crítica (4). Sin embargo, los nuevos paradigmas destacan la interacción entre los cambios complejos en el microbioma y las respuestas inmunes innatas y adaptativas (5). Por ello, actualmente, ha habido un cambio en el concepto microbiológico de la etiología de la periodontitis, el modelo sugerido es que la enfermedad se origina por una disbiosis que perturba el biofilm oral ecológicamente estable y que está en homeostasis con el tejido periodontal (6).

1. 2. 1. Disbiosis

La cavidad bucal es un nicho ecológico en el que habitan multitud de microorganismos en simbiosis (equilibrio), y mientras ésta se mantenga existe salud; cuando el equilibrio se pierde, ya sea por modificación de la diversidad o por cambio en la proporción relativa de los organismos, se genera disbiosis (7).

Según Joshua Lederberg, el término microbiota se refiere a los microorganismos que viven en un entorno dado, mientras que el término microbioma, se define como una comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos o patógenos que comparten un espacio de nuestro cuerpo (8).

El microbioma es una estructura altamente compleja que involucra millones de unidades taxonómicas diferentes y relacionadas entre ellas. Incluso, se ha llegado a proponer que es un órgano más en sí mismo dentro del cuerpo humano con su propia fisiología y patologías asociadas, cuyo estudio y diagnóstico involucra análisis metagenómicos (9).

La relación entre microbioma y huésped es dinámica, y está influenciada por muchos aspectos de la vida moderna los cuales pueden desequilibrar el ecosistema (7). Así, la alteración del microbioma se ha relacionado con: a) exposición a moléculas perturbadoras (azúcares, gluten, agua clorada, antibióticos, una variedad de químicos); b) escasez de nutrientes que promueven colonias saludables (dietas deficientes en vegetales o altas en grasas saturadas); y, c) situaciones que promueven y mantienen el estrés (10).

Existe un modelo de desarrollo de enfermedad que pone énfasis en la teoría de bacterias específicas o patógenos clave (*keystone pathogens*). Se cree que ellas son las desencadenantes del desarrollo de la periodontitis y, aunque esta teoría es intuitivamente sólida, la evidencia no es concluyente (11). El microbioma oral en salud, es simbiótico (12). Las bacterias consideradas patógenas pueden estar presentes en salud, y no comportarse como patógenos (13).

Bartold y otros (11), afirman que la periodontitis es un continuo donde ocurren inflamación, destrucción de tejidos y disbiosis microbiana modificada por factores como el tabaquismo, las enfermedades sistémicas y la genética.

I. 3. Análisis del microbioma

I. 3. 1. Técnicas para el estudio del microbioma

Tradicionalmente, el cultivo bacteriano se ha considerado el método de referencia para estudiar la microbiota oral. Sin embargo, una de las principales dificultades o desventajas de esta técnica es la imposibilidad de caracterizar especies no cultivables. Debido a esto surgió la necesidad de desarrollar alternativas para proporcionar métodos de diagnóstico confiables y de alto rendimiento para la comprensión del papel de las bacterias en las enfermedades periodontales (14).

Un avance importante para el estudio del microbioma oral, ha sido el desarrollo de técnicas de secuenciación de la muestra que son útiles para los estudios metagenómicos, ya que permiten el análisis del genoma completo de una muestra microbiológica. Uno de los primeros métodos desarrollados fue la pirosecuenciación que se basaba en la incorporación de una molécula de pirofosfato en la reacción enzimática permitiendo determinar la secuencia a medida que se sintetiza la cadena complementaria de ADN (15).

Luego surgieron las técnicas de secuenciación de alto rendimiento (*high throughput sequencing*) que han permitido que los proyectos de secuenciación a gran escala se completen en un tiempo mucho menor que el que necesitaba la pirosecuenciación. El método pionero de esta tecnología fue el de secuenciación por síntesis de Sanger, desarrollado en 1977 (16). A partir de ahí comúnmente se denominan a las siguientes generaciones “*next generation*

sequencing”. La segunda generación trabaja por síntesis o por hibridación y requiere la amplificación de la muestra de ADN molde mediante PCR convencional como paso previo. Desde la tercera generación, existe la ventaja de poder secuenciar a partir de una molécula única, por lo que se evitan muchos de los errores que se pueden producir en la replicación del ADN. La cuarta generación se basa en nanoporos. A medida que avanza la tecnología, el objetivo será una secuenciación más rápida y precisa (tasas de error más bajas, artefactos mínimos) con menores cantidades de ADN y ARN de entrada a menor costo (17).

I. 3. 2. Diversidad taxonómica

Un grupo de genomas supuestamente idénticos, se conoce como una unidad taxonómica operativa (*Operational Taxonomic Unit*; OTU) o filotipo, los OTU toman el lugar de las "especies" en muchos análisis de diversidad de microbiomas, porque los genomas de especies nombradas a menudo no están disponibles para secuencias de marcadores específicos (18).

La asignación de secuencias a las OTU se denomina “*binning*”. Este proceso permite analizar una comunidad en términos de contenedores discretos u OTUs. Si cada OTU se trata como una categoría distinta, o cada secuencia 16S se agrupa en un filo u otra categoría taxonómica, se puede construir un histograma de recuentos con todo el conjunto de secuencias de microbiomas obtenidos. Alternativamente, este histograma también puede transformarse en binario (presencia/ausencia) para cada OTU (19).

Un concepto importante cuando se trata de OTUs es el de la diversidad de la población, el número de compartimientos distintos en una muestra o en la población de origen. Esto es de crítica importancia en la salud humana, ya que varias enfermedades han demostrado correlación con la disminución de la diversidad del microbioma, presumiblemente porque uno o varios microorganismos aumentan durante el desequilibrio inmune o nutricional (18).

I. 3. 3. Diversidad alfa y beta

Otra forma de medir la diversidad en una comunidad microbiana es ver si existe diversidad dentro de esta comunidad (diversidad alfa) o medir la diversidad entre dos o más comunidades (diversidad beta). A efectos prácticos podría decirse que la primera mide la diversidad dentro de una muestra, mientras que la segunda examina la extensión en la que

dos o más comunidades difieren; ambas pueden usarse para evaluar cómo una comunidad microbiana cambia con el tiempo o con diferentes estados de enfermedad (20).

Dentro de una comunidad existen estimadores tales como Chao (21), ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*) (22) y Jackknife (23) que nos permiten calcular la diversidad alfa, el número y la distribución de taxones esperados dentro de una población. Estos dan origen a curvas de rarefacción, ya que un número creciente de taxones secuenciados permite hacer estimaciones cada vez más precisas de la diversidad de la población total (24).

Adicionalmente, al comparar poblaciones múltiples, las medidas de diversidad beta, incluida la superposición absoluta o relativa, describen cuántos taxones se comparten entre ellos (18). Entonces, la diversidad alfa actúa como un resumen estadístico de una población y a menudo se cuantifica con el índice de Shannon (25) o de Simpson (26), mientras que la diversidad beta actúa como un puntaje de similitud entre las poblaciones, y puede medirse mediante la simple superposición de taxones o cuantificarse por la disimilitud de Bray-Curtis (27).

Por otro lado, la diversidad dentro o entre las comunidades se puede analizar en términos de su distribución filogenética. Este método de cuantificar la diversidad de la comunidad se describe en términos de la amplitud o profundidad total de las ramas filogenéticas abarcadas por un microbioma (18).

I. 4. Microbioma oral

La boca alberga uno de los más diversos microbiomas en el cuerpo humano, incluyendo virus, hongos, protozoos, arqueas y bacterias. Estas últimas, son responsables de dos de las más comunes enfermedades bacterianas del ser humano: caries y periodontitis (28).

El microbioma oral, es increíblemente complejo, en promedio un adulto alberga entre 50 y 100 billones de bacterias que representan alrededor de 200 especies dominantes. Existen aproximadamente 700 taxones predominantes de los cuales menos de un tercio aún no han sido cultivados (29).

Se reconocen distintos hábitats de colonización microbiana en la cavidad bucal: dientes, surco gingival, encías, lengua, mejillas, labios y paladar. Ellos constituyen un sistema

ecológico muy heterogéneo y favorecen el crecimiento de diferentes comunidades microbianas (30).

Debido a esta heterogenicidad de especies presentes, para llegar a comprender por completo las interacciones microorganismo-huésped que ocurren en salud y enfermedad, es necesario combinar el enfoque filogenético, metagenómico, transcriptómico, proteómico y metabólico (18). Para mantener un estado saludable y prevenir enfermedades, es necesario considerar al huésped y sus residentes como un todo. La colaboración y el antagonismo entre las especies del biofilm contribuyen a la estabilidad ecológica, tienen un impacto en la virulencia y el potencial patogénico de las bacterias y están involucrados en la tolerancia a las defensas del huésped y a los agentes antimicrobianos (31).

Dado lo anterior, definir una composición precisa es difícil ya que es un sistema abierto y frecuentemente expuesto a comida, agua, aire y a la microbiota normal de otros mamíferos incluyendo humanos a través del contacto social (28). Sin embargo, con el tiempo y gracias a la conjunción del enfoque tradicional y moderno, se han identificado microbiomas centrales y variables (32). El microbioma central, recibe la denominación de “*core*” y se utiliza para describir la microbiota menos variable de un nicho. Por otra parte, la porción variable del microbioma debido a la constante exposición de la cavidad bucal al medio ambiente, fluctúa bastante. Por ejemplo, en fumadores se ha detectado mayor proporción de anaerobios comparado con los no fumadores (33). Además, las variaciones geográficas y las condiciones climáticas pueden afectar de manera significativa a la composición de la microbiota oral (34). Por lo que cada individuo es colonizado por un microbioma único (35).

Dewhirst y otros (30), fueron los primeros en publicar resultados de análisis de microbioma oral humano tras secuenciar el gen 16S en el año 2010; utilizando un nivel de similitud de 98,5%, obtuvieron aproximadamente 800 secuencias que distribuyeron en 619 taxones, los cuales clasificaron según dominio, filo, clase, orden, familia, género y especie. Identificaron 6 filos mayores que contenían el 96% del total de taxones: *Firmicutes* (36,7%), *Bacteroidetes* (17,1%), *Proteobacteria* (17,1%), *Actinobacteria* (11,6%), *Spirochaetes* (7,9%), *Fusobacteria* (5,2%). El 4% de taxones restantes, estaban contenidos en los filos siguientes: *Euryarchaeota*, *Chlamydia*, *Chloroflexi*, *SR1*, *Synergistetes*, *Tenericutes* y *TM7* (30).

Dentro del filo *Firmicutes*, *Streptococcus* (19,2%) es el género más abundante seguido de *Veillonella* (8,6%). La secuenciación de alto rendimiento, adiciona especies como *Derxia* y *Leptotrichia* al microbioma central oral (36). Los doce géneros menos compartidos: *Chryseobacterium*, *Anaeroglobus*, *Filifactor*, *Lactobacilus*, *Johnsonella*, *Shuttleworthia*, *OD2* (no clasificado), *Brachymonas*, *Propiniovibrio*, *Scardovia*, *Olsenella*, *Cryptobacterium* representan el microbioma variable de la cavidad oral. Además, *Bulleidia*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Gemella*, *Selenomonas* y *Oribacterium* (*Firmicutes*), *Eikenella*, *Kingella*, *Lautropia* (*Proteobacteria*), *Propionibacterium* (*Actinobacteria*) y *Porphyromonas* (*Bacteroidetes*), se han identificado en 50-99% de individuos como constituyentes del microbioma variable (37). Entre hongos y arqueas que también han sido identificadas en la cavidad oral, *Candida spp.* es uno de los taxones más comunes (32).

Segata y otros en 2012 (35), observaron que la boca estaba colonizada por tres comunidades bacterianas distintas, basándose en la proporción de dos filos: *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Un grupo estaba formado por la microbiota de la mucosa bucal, la encía queratinizada y el paladar duro. Otro grupo estaba formado por la saliva, la lengua, las amígdalas y la garganta (pared posterior de la orofaringe); y el último grupo por el biofilm (supra y subgingival). Es decir, cada uno de estos grupos exhibían comunidades distintivas (35). Se ha reportado, además, que las bacterias orales poseen predilección por ciertos nichos, así *Firmicutes* y *Actinobacteria* son más abundantes en el biofilm dental, mientras que los *Bacteroidetes* anaerobios (*Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Flavobacterium*) preferirían nichos del dorso y superficies laterales de la lengua y espacios microaerofílicos (38).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* son las tres bacterias periodontales que están fuertemente asociadas con la periodontitis según la evidencia existente (39), pero cuya abundancia no es significativa en todos los estudios, o incluso estas especies se observan en individuos periodontalmente sanos (37). Con respecto a *P. gingivalis*, existe una hipótesis que lo señala como patógeno clave, es decir que podría ser capaz de provocar periodontitis debido a sus diversos factores de virulencia, que le permitirían desencadenar cambios en la microbiota conducentes a la rotura de la homeostasis con el huésped, la evasión de la respuesta inmune de éste, disbiosis y por consiguiente desarrollo de la enfermedad (40).

I. 5. Hipótesis

Hipótesis nula (H_0): Al comparar el microbioma de sujetos españoles con un estado periodontal de salud/gingivitis con otros diagnosticados con periodontitis estadio III/IV, no se encontrarán diferencias microbiológicas a nivel de filo, género o especie entre estas dos condiciones.

Hipótesis alternativa (H_1): Al comparar el microbioma de sujetos españoles con un estado periodontal de salud/gingivitis con otros diagnosticados con periodontitis estadio III/IV, sí se encontrarán diferencias microbiológicas a nivel de filo, género o especie.

I. 6. Objetivo

El objetivo principal de este trabajo, es comparar las diferencias a nivel de microbioma entre sujetos españoles con un estado periodontal de salud/gingivitis y diagnosticados con periodontitis estadio III/IV, utilizando para ello el sistema de secuenciación MiSeq (Illumina®, San Diego/California, USA).

II. Material y método

II. 1. Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio de tipo transversal.

II. 2. Participantes

La muestra fue seleccionada de entre los pacientes que asistieron a las clínicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid y a varias clínicas privadas ubicadas también en Madrid, que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión que se detallan a continuación. La selección de pacientes fue entre octubre 2019 y febrero 2020.

Criterios de inclusión:

- Españoles entre 30 y 60 años.

- Sujetos periodontalmente sanos y/o con gingivitis, en periodonto intacto o reducido sin periodontitis (1).
- Sujetos con periodontitis estadio III y IV, según la clasificación del *World Workshop* de 2017 (2).

Criterios de exclusión:

- Tratamiento periodontal en el año previo.
- Patología periodontal aguda tales como abscesos o enfermedad periodontal necrotizante.
- Enfermedades sistémicas (diabetes, defectos cuantitativos o cualitativos de los neutrófilos polimorfonucleares, desórdenes del sistema inmune).
- Uso de antiinflamatorios, anticonvulsivantes, inmunosupresores, bloqueadores de los canales de calcio, durante los 6 meses previos.
- Antibioterapia durante los 3 meses previos.
- Embarazo.

II. 3. Visitas

II. 3. 1. Visita de selección

Las variables demográficas como edad y género fueron registradas al inicio del estudio. Se aplicó un cuestionario médico, y en caso de cumplir con los criterios de inclusión y exclusión los pacientes fueron verbalmente informados del estudio y se les solicitó su participación, para lo cual otorgaron su autorización firmando un consentimiento informado. Luego de aceptar, se programó la visita de estudio.

II. 3. 2. Visita de estudio

Evaluación clínica

Cada paciente recibió un examen periodontal completo y radiografías (ortopantomografía y/o serie periapical radiográfica). A continuación, el estado periodontal de los sujetos incluidos fue confirmado según el siguiente criterio:

- Salud y gingivitis: no hay pérdida de inserción clínica interproximal, ni pérdida ósea radiográfica y una profundidad de sondaje ≤ 3 mm, asumiendo que no hay pseudobolsas (1).
- Periodontitis estadio III y IV: existe pérdida de inserción clínica interproximal ≥ 5 mm y pérdida ósea radiográfica que se extiende al tercio medio o apical de la raíz. Puede haber evidencia de pérdida dental periodontal de hasta 4 dientes en el estadio III, y 5 dientes en el estadio IV (2).

Variables clínicas

Las medidas fueron tomadas en 6 localizaciones por diente (en todos los dientes, excepto en los terceros molares), con la sonda periodontal UNC-15 (HuFriedy, Leinmen, Germany) por un examinador. Todos los participantes recibieron el mismo examen clínico que incluía lo siguiente:

- Índice de placa, presencia de placa visible mediante tinción de eritrosina (Plac-Control®; Dentaïd, Barcelona, Spain), y expresado en porcentaje (41).
- Recesión gingival, distancia desde la unión amelocementaria hasta el margen gingival y redondeada al milímetro más cercano.
- Profundidad de sondaje, medida desde el margen gingival hasta el fondo de la bolsa y redondeada al milímetro más cercano.
- Nivel de inserción clínica, distancia desde el fondo de la bolsa hasta la unión amelocementaria.
- Sangrado al sondaje, observado tras medir la profundidad de sondaje y expresado en porcentaje (42).

Muestras microbiológicas

Las muestras fueron tomadas con dos puntas de papel estériles consecutivas #30 (Maillefer, Ballaigues, Switzerland), insertándolas en el surco gingival o bolsa y dejándola en el lugar durante 10 segundos. Antes de tomar la muestra, el biofilm supragingival fue eliminado de la localización y la saliva secada con tómulas de algodón y aire comprimido. Todas las puntas de papel fueron transferidas a un vial que contenía 1,5 ml de medio de transporte RTF (43)

y enviadas al laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid dentro de las 24 horas posteriores.

Se seleccionaron cuatro localizaciones en cada paciente, una por cuadrante de la siguiente manera:

- En individuos del grupo salud/gingivitis, las muestras se tomaron de los primeros molares (en mesio vestibular para inferiores y en mesio palatino para superiores). En su ausencia se tomó del segundo molar adyacente, siendo la siguiente alternativa el segundo premolar y desde ahí cualquier diente presente en mesial.
- En sujetos con periodontitis, las muestras fueron tomadas de las localizaciones más accesibles con mayor profundidad al sondaje y/o sangrado al sondaje por cuadrante.

II. 4. Procedimiento microbiológico

En el laboratorio, las muestras fueron homogeneizadas mediante un vórtex durante 30 segundos y se prepararon para cultivo bacteriano. Después, las puntas de papel fueron eliminadas y el líquido remanente del vial preparado para la extracción de ADN y reacción de qPCR. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos y el supernadante fue descartado. El sedimento se procesó con un kit comercial para extracción de ADN (MolYsis Complete5. Molzym GmbH & Co. KG. Bremen, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución final del ADN fue hecha en 100 µl de agua (Water PCR grade, Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Germany).

Por último, el ADN aislado fue enviado al laboratorio externo FISABIO, ubicado en Valencia donde se realizó la secuenciación masiva con equipo Illumina® utilizando el sistema MiSeq. Primero, usando cebadores personalizados se obtuvieron los amplicones siguiendo el protocolo Illumina de preparación de la biblioteca de secuenciación metagenómica del gen 16S rDNA (Cod. 15044223 Rev. A). Se utilizó ADN genómico microbiano (5 ng/µl en Tris 10 mM pH 8,5) para iniciar el protocolo. Después de la amplificación del gen, el paso de multiplexación se realizó usando el Kit Nextera XT Index (FC-131-1096). Se ejecutó 1µl del producto de PCR en un chip Bioanalyzer DNA 1000 para verificar el tamaño (el esperado en una traza Bioanalyzer es de ~ 550 pb). Luego, las bibliotecas se secuenciaron usando un ciclo

de 2x300pb en pares (Kit de reactivos MiSeq v3 (MS-102-3001)) en un secuenciador MiSeq de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina®). El análisis de calidad fue llevado a cabo usando el programa Prinseq-lite. En cuanto al análisis bioinformático, éste se realizó mediante una canalización ad-hoc escrita en un entorno RStatistics utilizando varias bibliotecas de código abierto. Los datos fueron agrupados y estratificados, y analizados con Qiime 2. Con los complementos Qiime se hizo el análisis metataxonómico y la asignación de las afiliaciones taxonómicas con el clasificador Bayesiano Naive. La base de datos usada para la asignación taxonómica fue SILVA_release_132. La eliminación de ruidos, unión de extremos y el agotamiento de las quimeras, se realizó a partir de datos de extremos usando DADA2.

II. 5. Análisis estadístico

II. 5. 1. Tamaño muestral

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó en base al índice de Shannon (diversidad alfa). Por lo tanto, se estimó que para encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre grupos de 0,5 con una desviación estándar de 0,35 basado en el estudio de Schulz y otros (44), con un riesgo del 5% y una potencia del 90% se necesitarían al menos 9 sujetos por grupo.

El muestreo fue de tipo no probabilístico de casos consecutivos y se distribuyó a los participantes de la siguiente manera:

-Salud/gingivitis: 10 pacientes

-Periodontitis estadio III/IV: 10 pacientes

II. 5. 2. Análisis de los datos

Todo el análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS v.20 (SPSS Inc, IBM, Chicago, IL). El nivel de significación estadística se estableció en 0,05. La normalidad de la distribución se analizó verificando la asimetría y el apuntamiento mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Para la descripción demográfica y clínica de las muestras, en el caso de variables cuantitativas se utilizó el test t de Student para muestras independientes, y cuando los datos no seguían una distribución normal se usó el test U de Mann-Whitney. Para las variables categóricas se utilizó la prueba de Chi cuadrado.

Para la descripción microbiológica de las muestras, los datos se presentaron como valores medios de proporciones de los distintos estratos de OTUs. El número de lecturas por muestra fue transformado a abundancia relativa, y las comunidades microbianas a nivel de especie, género y filo fueron tabuladas.

Para el análisis de los datos microbiológicos, se usó el test U de Mann-Whitney entre grupos por taxones. Las tablas que se presentan en este trabajo muestran solamente los taxones con valores de $p \leq 0,05$.

Para evaluar la diversidad alfa, se utilizaron los índices: Shannon, Chao1, Simpson y ACE.

III. Resultados

III. 1. Características de los sujetos

III. 1. 1. Características demográficas y hábito tabáquico

Fueron reclutados 20 sujetos de los cuales, 10 fueron sin periodontitis y los otros 10 diagnosticados con periodontitis estadio III/IV. En el grupo salud/gingivitis la edad media (desviación estándar) fue de 40,10 (5,78) años y en el grupo de periodontitis fue de 44,70 (4,66) años, sin observarse diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,063$). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en el sexo ($p=1,000$), encontrándose en el grupo salud/gingivitis un total de 5 mujeres y 5 hombres, mientras que el grupo de periodontitis estadio III/IV estaba formado por 6 mujeres y 4 hombres (Tabla 1).

Respecto del hábito tabáquico, el número de pacientes fumadores fue ligeramente mayor en el grupo periodontitis estadio III/IV que en el de salud/gingivitis (5 y 2 sujetos, respectivamente). Por el contrario, el número de participantes no fumadores fue ligeramente

mayor en el grupo de salud/gingivitis que en el de periodontitis (8 y 5 sujetos, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,350$) (Tabla 1).

III. 1. 2. Parámetros clínicos periodontales

En cuanto a los parámetros clínicos, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El índice de placa tuvo una media (desviación estándar) de 0,53 (0,21) en el grupo de salud/gingivitis y de 0,84 (0,33) en el grupo de periodontitis estadio III/IV ($p=0,011$). La media (desviación estándar) de profundidad de sondaje fue 2,45 (0,19) mm en el grupo de salud/gingivitis *versus* 3,89 (1,00) mm en el grupo de periodontitis ($p=0,001$). La media (desviación estándar) del nivel de inserción clínica en el grupo de salud/gingivitis fue 2,44 (0,19) mm mientras que en el grupo de periodontitis fue 4,60 (0,98) mm ($p=0,000$). El índice de sangrado al sondaje tuvo un valor medio (desviación estándar) de 0,17 (0,13) en el grupo de salud/gingivitis y de 0,61 (0,29) en el grupo de periodontitis estadio III/IV ($p=0,001$) (Tabla 2).

III. 2. Composición taxonómica del microbioma subgingival

Después de secuenciar las veinte muestras de ADN provenientes del biofilm subgingival de los sujetos, se obtuvieron 2.531.326 lecturas totales. El tamaño medio de las lecturas filtradas fue de 299 pares de bases.

Las secuencias detectadas se agruparon en 961.981 OTUs en el grupo de salud/gingivitis y 1.035.161 OTUs en el grupo de periodontitis, con un nivel de similitud de 97%; y fueron asignadas a 14 filos, 23 clases, 54 órdenes, 112 familias, 237 géneros y 501 especies. La mayor parte de los OTUs pertenecían a los 3 filos principales que incluyeron: *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Fusobacteria* (Tabla 3).

III. 3. Comparación de composición taxonómica del microbioma subgingival

De manera global, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la composición del microbioma entre ambos grupos, incluso en altos rangos taxonómicos, incluyendo 8 filos, 11 clases, 22 órdenes, 47 familias, 75 géneros y 107 especies.

III. 3. 1. A nivel de filo

Proporción

El microbioma subgingival observado en pacientes del grupo salud/gingivitis, estuvo dominado por el filo *Firmicutes* (41,01%), seguido por *Fusobacteria* (19,87%) y *Bacteroidetes* (15,69%); y en menor proporción *Actinobacteria* (4,81%) y *Proteobacteria* (9,81%). Mientras que en el grupo de periodontitis, predominó el filo *Bacteroidetes* (31,45%), seguido de *Firmicutes* (28,77%) y *Fusobacteria* (19,35%); y en menor proporción *Spirochaetes* (5,05%) y *Synergistetes* (5,58%) (Tabla 3 y Gráfico 1).

Abundancia relativa

Se observó una mayor abundancia relativa en el grupo de salud/gingivitis con respecto al grupo de periodontitis de *Firmicutes* [39,37% versus 26,91%, respectivamente ($p=0,0284$)], *Actinobacteria* [5,15% versus 1,26%, respectivamente ($p=0,0003$)], y *Proteobacteria* [8,35% versus 2,68%, respectivamente ($p=0,0082$)], de manera estadísticamente significativa ($p\leq 0,05$) (Tabla 4).

En el grupo de periodontitis, la abundancia relativa de los siguientes filos mostraba un aumento estadísticamente significativo ($p\leq 0,05$) con respecto al grupo de salud/gingivitis: *Bacteroidetes* [29,37% versus 16,35%, respectivamente ($p=0,0002$)], *Synergistetes* [8,11% versus 1,14%, respectivamente ($p=0,0002$)], *Spirochaetes* [5,26% versus 1,84%, respectivamente ($p=0,0041$)] (Tabla 4).

III. 3. 2. A nivel de género

Proporción

El género con mayor proporción del microbioma subgingival en el grupo de salud/gingivitis fue *Streptococcus* (17,22%), seguido de *Fusobacterium* (14,47%). Los miembros del género *Neisseria* (3,61%), *Capnocytophaga* (2,87%) y *Campylobacter* (2,72%) se observaron como constituyentes menores (Tabla 5).

En el grupo de periodontitis, el género predominante fue *Fusobacterium* (16,50%), seguido de *Porphyromonas* (7,98%), *Tannerella* (7,44%), *Fretibacterium* (5,59%), *Streptococcus* (5,48%), *Treponema* (5,04%) y *Filifactor* (5%) (Tabla 6).

Abundancia relativa

Entre los géneros estadísticamente más abundantes ($p \leq 0,05$) en el grupo de salud/gingivitis que en el de periodontitis se detectaron: *Streptococcus* [15,12% versus 4,94%, respectivamente ($p=0,0126$)], *Leptotrichia* [5,46% versus 1,76%, respectivamente ($p=0,0023$)], *Neisseria* [2,63% versus 0,28%, respectivamente ($p=0,0018$)], *Capnocytophaga* [2,77% versus 0,69%, respectivamente ($p=0,0102$)] (Tabla 7).

De los 236 géneros bacterianos detectados, 27 de ellos fueron estadísticamente más abundantes en el grupo de periodontitis frente al de salud/gingivitis ($p \leq 0,05$), incluyendo *Porphyromonas* [7,44% versus 3,43%, respectivamente ($p=0,0343$)], *Tannerella* [6,67% versus 1,88%, respectivamente ($p=0,0005$)] y *Treponema* 2 [5,26% versus 1,84%, respectivamente ($p=0,0041$)]. Otros géneros que mostraron una abundancia mayor y estadísticamente significativa en el grupo de periodontitis que en el de salud/gingivitis fueron: *Filifactor* [4,38% versus 1,10%, respectivamente ($p=0,0025$)] y *Prevotella* 7 [2,29% versus 0,91%, respectivamente ($p=0,0494$)] (Tabla 7).

III. 3. 3. A nivel de especie

Proporción

En el grupo de pacientes del grupo salud/gingivitis, se identificaron en mayor proporción una serie de bacterias sin nombre del género *Fusobacterium* (16,47%) y *Streptococcus* (14,23%) (Tabla 8).

Entre las especies mayormente identificadas en el grupo de periodontitis, destacaron una sin nombre del género *Fusobacterium* (16,49%), *T. forsythia* (7,03%) y otras bacterias de los géneros F0058 (6,71%), *Porphyromonas* (4,59%), *Streptococcus* (4,92%) y *Filifactor* (4,99%). Se detectó la presencia de *Campylobacter rectus* (1,2%) y *A. actinomycetemcomitans* HK1651 (0,53%) en bajo porcentaje (Tabla 9).

Abundancia relativa

Se revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en 118 especies entre ambos grupos.

Especies con mayor abundancia relativa, estadísticamente significativa, en pacientes del grupo salud/gingivitis frente al grupo de periodontitis fueron: *Streptococcus sanguinis* [1,19% versus 0,04%, respectivamente ($p=0,0043$)], *Corynebacterium durum* [0,33% versus 0,01%, respectivamente ($p=0,0423$)] y *Capnocytophaga gingivalis* [0,28% versus 0,06%, respectivamente ($p=0,0110$)] (Tabla 10).

En el grupo de periodontitis, destacaron diversas especies por detectarse en mayores proporciones, estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), que en el grupo de salud/gingivitis. Estas especies fueron: *T. forsythia* [6,22% versus 0,65%, respectivamente ($p=0,0004$)], una bacteria del género F0058 [6,15% versus 1,27%, respectivamente ($p=0,0191$)], otras bacterias del género *Filifactor* [4,38% versus 1,10%, respectivamente ($p=0,0025$)], bacterias sin nombre del género *Fretibacterium* [4,27% versus 0,51%, respectivamente ($p=0,0002$)], *Deferribacteraceae bacterium* [2,13% versus 0,47%, respectivamente ($p=0,0011$)], bacteria no cultivable del género *Synergistetes* [1,69% versus 0,27%, respectivamente ($p=0,0022$)], *Eubacterium saphenum* ATCC 49989 [1,77% versus 0,33%, respectivamente ($p=0,0069$)], *Desulfobulbus* sp Dsb1 [1,32% versus 0,23%, respectivamente ($p=0,0007$)] y *Chloroflexi bacterium oral taxon 439 isolate Ch12* [1,21% versus 0,12%, respectivamente ($p=0,0006$)] (Tabla 10).

III. 4. Diversidad bacteriana

III. 4. 1. Diversidad alfa

Índices de diversidad alfa

Se utilizó el índice de Shannon para determinar la diversidad microbiana a nivel de especie, encontrando un valor ligeramente mayor, no estadísticamente significativo ($p=0,7335$), en la microbiota subgingival del grupo salud/gingivitis (3,63) que en el grupo de periodontitis (3,54) (Tabla 11).

De igual manera, no se observó diferencia significativa en la riqueza de especies (número de OTUs) entre ambos grupos de estudio. Se calculó el índice de Chao1, mostrando niveles medios de 179,80 y 170,55 para grupo salud/gingivitis y periodontitis, respectivamente ($p=0.9096$) (Tabla 11). La riqueza de la cantidad total de bacterias determinada mediante el índice ACE, fue también mayor en la microbiota subgingival en el grupo sin periodontitis en comparación con el de las muestras del grupo con periodontitis (179,81 *versus* 170,63; respectivamente), no existiendo tampoco diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.9096$) (Tabla 11).

La uniformidad se expresó con el índice Simpson, que tuvo una tendencia idéntica entre ambos grupos (0,93) ($p=0.5128$) (Tabla 11).

IV. Discusión

Los resultados de este trabajo realizado para analizar y comparar la composición del microbioma oral de los pacientes con salud/gingivitis y periodontitis estadio III/IV muestran que existe una serie de diferencias en el microbioma de ambas condiciones clínicas. Se detectaron 3 filos principales: *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Fusobacteria*, cuya proporción varió dependiendo del grupo. En los sujetos pertenecientes al grupo salud/gingivitis, la mayor proporción la obtuvo el filo *Firmicutes*; mientras que en el grupo periodontitis estadio III/IV fue *Bacteroidetes*. A nivel de género, el dominante en el grupo de salud/gingivitis fue *Streptococcus*, mientras que en el grupo con periodontitis estadio III/IV fue *Fusobacteria*. A nivel de especie, la diversidad alfa de las comunidades subgingivales no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre grupos, aunque este índice fue ligeramente mayor en individuos del grupo salud/gingivitis.

Para la comparación de la composición taxonómica del microbioma subgingival, este trabajo utilizó el sistema de secuenciación masiva Illumina®. Como éste, existen numerosos trabajos que han querido estudiar las diferencias del microbioma oral entre grupos de sujetos sanos y enfermos, más aún en las últimas décadas gracias a las nuevas tecnologías. Sin embargo, la clasificación de las enfermedades periodontales cambió con el *World Workshop* de 2017,

motivo por el cual comparar los resultados de este trabajo con otros que hayan utilizado exactamente la misma clasificación es complejo más, no imposible.

Respecto al análisis de microbioma, en general, al trabajar con el gen 16S del ARNr surge un desafío bioinformático relacionado con la definición precisa de secuencia "única". Aunque gran parte de este gen está altamente conservado, varias de las regiones secuenciadas son variables, por lo que pequeñas cantidades de pares de bases pueden cambiar en un período muy corto de tiempo evolutivo (45). Además, existe la probabilidad de que se genere al menos un error al secuenciar las diferentes regiones del gen 16S. Esto significa que esperar que las etiquetas sean 100% idénticas es extremadamente exigente e irreal, y se tratarán las copias clonales de los genomas como organismos diferentes. Por lo tanto, está permitido cierto grado de divergencia en la secuencia, así: 95, 97 o 99% son cortes de similitud de secuencia usados en la práctica (46). En este trabajo se consideró una similitud de pares de bases del 97% para realizar la clasificación taxonómica, al igual que en el trabajo de Shi y otros (47).

A nivel de filo, al contrastar los resultados de este trabajo con los de otros autores, se observa por ejemplo que, Schulz y otros (44) encontraron una mayor prevalencia de los filos *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* y *Synergistetes* en el grupo con periodontitis; mientras que en el grupo de sujetos sanos, encontraron predominancia de *Proteobacterias* y *Firmicutes* y *Actinobacteria* (44).

A nivel de género, Shi y otros (47) encontraron que *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Treponema* 2 y *Capnocytophaga* representaban a más del 60% de las secuencias de las muestras subgingivales. En este trabajo, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa de 9 de ellos, siendo dominadas las secuencias por los géneros *Streptococcus* en los sujetos sanos, y por *Porphyromonas* en los sujetos con periodontitis. Este resultado coincide con el trabajo de Liu y otros (48), quienes observaron que *Streptococcus* era el género más preponderante en los sujetos sanos. Sin embargo, en las bolsas periodontales de sujetos con periodontitis, el género dominante encontrado por ellos fue *Prevotella*.

A nivel de especie, *T. forsythia* fue la única de las tres bacterias asociadas fuertemente con periodontitis, según la evidencia disponible, que se detectó en este trabajo con diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Por otro lado, *P. gingivalis*, designado por numerosos autores como un patógeno periodontal clave para desencadenar disbiosis y consecuentemente periodontitis, no fue particularmente encontrado en este estudio. Otros autores como Schulz y otros (44) o Deng y otros (49) sí lo encontraron asociado a las muestras de sus pacientes con periodontitis. Estos hallazgos tienen concordancia con lo expresado por Bik y otros (37), quienes señalan que la abundancia de los patógenos fuertemente asociados a periodontitis (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*), no es significativa en todos los estudios. Sin embargo, Socransky y Haffajee (50) señalaron que estas especies deberían sin lugar a dudas ser halladas más frecuentemente y en mayores proporciones en sujetos con periodontitis que en aquellos libres de esta patología. Este antecedente sumado al hecho de que *P. gingivalis* es altamente prevalente en población española según cultivo, nos hace sospechar que pudiese haber un error en la identificación de este patógeno específico y se está buscando la manera de comprobarlo.

Se considera que la diversidad microbiana medida con el índice de Shannon podría utilizarse como predictor del estado periodontal (51); sin embargo no existe consistencia entre los hallazgos reportados por distintos autores. Así por ejemplo, Galimanas y otros (52) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en este índice al comparar un grupo de pacientes sanos con otro de periodontitis crónica, lo que coincide con el resultado de este trabajo. Sin embargo, Deng y otros (49) que compararon los mismos grupos, obtuvieron un índice de Shannon menor en los individuos enfermos. Contrariamente, Abusleme y otros (53), también con los mismos grupos, obtuvieron un índice de Shannon mayor en el grupo con periodontitis crónica. Schulz y otros (44) compararon un grupo con periodontitis agresiva con uno de sanos, encontrando un índice de Shannon menor en los enfermos.

El cambio en la composición del microbioma desde el estado de salud periodontal al de periodontitis III/IV coincide con la de otros autores. En este trabajo se ha observado que en las muestras de periodontitis se detectó mayor abundancia de especies que en las de los sanos, y con una diferencia estadísticamente significativa. Griffen y otros (54) informaron que, en comparación con las localizaciones sanas de sujetos sin periodontitis, las especies bacterianas

subgingivales de las bolsas profundas de pacientes con periodontitis se enriquecieron con 123 especies que eran significativamente más abundantes en la enfermedad, mientras que en salud sólo 53 especies fueron significativamente más abundantes. Estos hallazgos podrían reflejar que la perturbación de las defensas del huésped en periodontitis permite la proliferación de un mayor número de especies bacterianas, especialmente de aquellos comensales no patógenos que podrían favorecer el crecimiento de bacterias patógenas.

Finalmente, cabría mencionar que, si bien es cierto mediante la secuenciación de alto rendimiento es posible conocer la proporción y abundancia relativa a nivel de filo, género y especie como se hizo en este trabajo, sería interesante investigar las interacciones bacterianas que ocurren en salud y enfermedad. Al respecto, Duran-Pinedo y otros (55), nos indican que el análisis de patrones específicos de co-ocurrencia microbiana es útil para identificar asociaciones representativas e importantes en enfermedades polimicrobianas. Estos autores, en una revisión de 2015, volvieron a hacer énfasis en este punto señalando que las investigaciones no deberían enfocarse solamente en conocer la composición del microbioma, sino que habría que dar un paso más y realizar un análisis funcional de las comunidades (56).

Tomando en cuenta lo anterior, la limitación del presente estudio es que solamente se concentró en el análisis metagenómico de las muestras subgingivales. Por ello, para futuros estudios se recomienda añadir otras técnicas “ómicas”. Los estudios genómicos, sólo miden las moléculas de ADN, mientras que los estudios epigenómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos miden los estados químicos del ADN y sus proteínas de unión, ARN, proteínas y metabolitos, respectivamente (57). Entonces, al complementar los diferentes métodos y enfoques, por ejemplo usando:

- 1) la transcriptómica para detectar y cuantificar el ARN, reflejando así los genes que están expresados tanto en salud como en enfermedad;
- 2) la proteómica con el fin de caracterizar las proteínas presentes como origen o consecuencia de la periodontitis; y,
- 3) la metabolómica, ya que los cambios en el metaboloma dan información relevante sobre los procesos bioquímicos que ocurren en una patología determinada;

se podría realizar entonces un análisis de integración multiómica de los datos de los microbiomas (58), lo que permitiría obtener una visión global y más detallada de los procesos involucrados tanto en salud periodontal como en las enfermedades periodontales.

V. Conclusión

Usando secuenciación de alto rendimiento, se observan diferencias en el microbioma de individuos españoles entre el estado de salud/gingivitis y periodontitis estadio III/IV, en todos los niveles de la clasificación taxonómica.

VI. Anexos

			SALUD/GINGIVITIS	PERIODONTITIS III/IV	TOTAL	<i>p</i>
Edad	n		10	10	20	0,063
	Media		40,10	44,70	42,40	
	DE		5,78	4,66	5,63	
Sexo	Mujer	n	5	6	11	1,000
		%	50	60	55	
	Hombre	n	5	4	9	
		%	50	40	45	
Tabaco	No	n	8	5	13	0,350
		%	80	50	65	
	Sí	n	2	5	7	
		%	20	50	35	

n, tamaño de la muestra; DE, desviación estándar.

Tabla 1. Descripción de la muestra y comparación de los dos grupos en términos de variables demográficas y hábito tabáquico.

		SALUD/GINGIVITIS	PERIODONTITIS III/IV	<i>p</i>
I. placa	n	10	10	0,011
	Media	0,53	0,84	
	DE	0,21	0,33	
P. sondaje	n	10	10	0,001
	Media	2,45	3,89	
	DE	0,19	1,00	
N. inserción	n	10	10	0,000
	Media	2,44	4,60	
	DE	0,19	0,98	
Sangrado	n	10	10	0,001
	Media	0,17	0,61	
	DE	0,13	0,29	

n, tamaño de la muestra; DE, desviación estándar.

Tabla 2. Índice de placa, profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica y sangrado al sondaje analizado por grupos.

		SALUD/GINGIVITIS	PERIODONTITIS III/IV
FILO	<i>Actinobacteria</i>	4,81	1,28
	<i>Bacteroidetes</i>	15,69	31,45
	<i>Firmicutes</i>	41,01	28,77
	<i>Fusobacteria</i>	19,87	19,35
	<i>Proteobacteria</i>	9,81	2,84
	<i>Spirochaetes</i>	1,43	5,05
	<i>Synergistetes</i>	0,80	5,58
	<i>Otros</i>	6,45	5,68

Tabla 3. Proporciones (%) a nivel taxonómico de filos por grupo (sólo se muestran los filos con mayor proporción en ambos grupos).

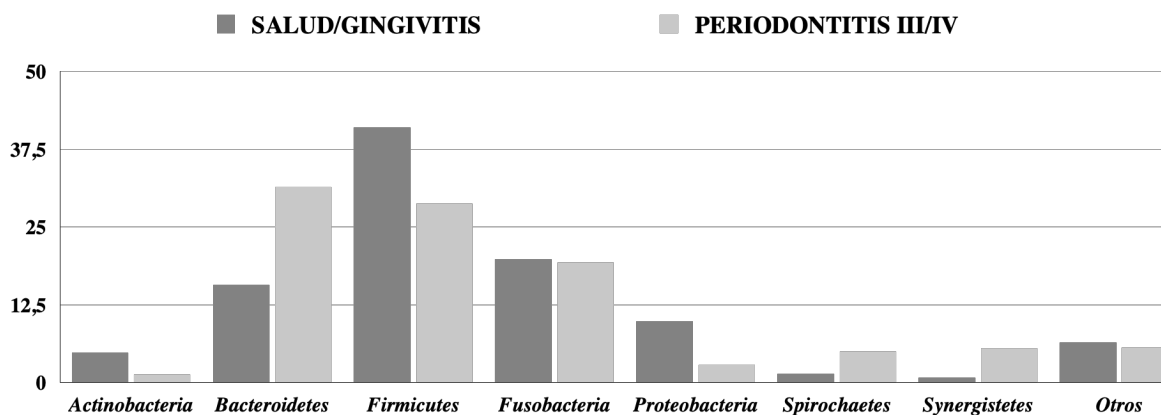


Gráfico 1. Representación gráfica de las proporciones (%) de los OTUs detectados a nivel taxonómico de filo, por cada grupo.

		SALUD/GINGIVITIS	PERIODONTITIS III/IV	<i>p</i>
FILO	<i>Actinobacteria</i>	5,15	1,26	0,0003
	<i>Bacteroidetes</i>	16,35	29,37	0,0002
	<i>Firmicutes</i>	39,37	26,91	0,0284
	<i>Proteobacteria</i>	8,35	2,68	0,0082
	<i>Spirochaetes</i>	1,84	5,26	0,0041
	<i>Synergistetes</i>	1,14	8,11	0,0002

Tabla 4. Comparativa de los valores medios de proporciones (%) a nivel de filo, para cada grupo.

		SALUD/GINGIVITIS
GÉNERO	<i>Streptococcus</i>	17,22
	<i>Fusobacterium</i>	14,47
	<i>Neisseria</i>	3,61
	<i>Capnocytophaga</i>	2,87
	<i>Campylobacter</i>	2,72

Tabla 5. Proporciones (%) de OTUs detectados a nivel de género, en el grupo salud/gingivitis.

		PERIODONTITIS III/IV
GÉNERO	<i>Fusobacterium</i>	16,50
	<i>Porphyromonas</i>	7,98
	<i>Tannerella</i>	7,44
	<i>Fretibacterium</i>	5,59
	<i>Streptococcus</i>	5,48
	<i>Treponema</i>	5,04
	<i>Filifactor</i>	5,00

Tabla 6. Proporciones (%) de OTUs detectados a nivel de género, en el grupo periodontitis estadio III/IV.

		SALUD/GINGIVITIS	PERIODONTITIS III/IV	<i>p</i>
GÉNERO	<i>Capnocytophaga</i>	2,77	0,69	0,0102
	<i>Filifactor</i>	1,10	4,38	0,0025
	<i>Leptotrichia</i>	5,45	1,76	0,0023
	<i>Neisseria</i>	2,63	0,28	0,0018
	<i>Porphyromonas</i>	3,43	7,44	0,0343
	<i>Prevotella 7</i>	0,91	2,29	0,0494
	<i>Streptococcus</i>	15,12	4,94	0,0126
	<i>Tannerella</i>	1,88	6,76	0,0005
	<i>Treponema 2</i>	1,84	5,26	0,0041

Tabla 7. Comparativa de los valores medios de proporciones (%) a nivel de género para cada grupo.

		SALUD/GINGIVITIS
ESPECIE	Sin nombre del género <i>Fusobacterium</i>	16,47
	Sin nombre del género <i>Streptococcus</i>	14,23

Tabla 8. Proporciones (%) de OTUs detectados a nivel taxonómico de especie en el grupo salud/gingivitis.

		PERIODONTITIS III/IV
ESPECIE	Sin nombre del género <i>Fusobacterium</i>	16,49
	<i>Tannerella forsythia</i>	7,03
	No cultivable del género F0058	6,71
	No cultivable del género <i>Filifactor</i>	4,99
	No cultivable del género <i>Streptococcus</i>	4,92
	No cultivable del género <i>Porphyromonas</i>	4,59
	<i>Campylobacter rectus</i>	1,20
	<i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> HK1651	0,53

Tabla 9. Proporciones (%) de OTUs detectados a nivel taxonómico de especie en el grupo periodontitis estadio III/IV.

		SALUD/GINGIVITIS	PERIODONTITIS III/IV	p
ESPECIE	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0,28	0,06	0,0110
	<i>Corynebacterium durum</i>	0,33	0,01	0,0423
	<i>Chloroflexi bacterium oral taxon 439 isolate Chl2</i>	0,12	1,21	0,0006
	<i>Desulfobulbus sp. Dsb1</i>	0,23	1,32	0,0007
	<i>Eubacterium saphenum</i> ATCC 49989	0,33	1,77	0,0069
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,19	0,04	0,0043
	<i>Tannerella forsythia</i>	0,65	6,22	0,0004
	Sin nombre del género <i>Fretibacterium</i>	0,51	4,27	0,0002
	No cultivable del género <i>Deferribacteraceae</i>	0,47	2,13	0,0011
	No cultivable del género <i>Filifactor</i>	1,10	4,38	0,0025
	No cultivable del género F0058	1,27	6,15	0,0191
	No cultivable del género <i>Synergistetes</i>	0,17	1,69	0,0022

Tabla 10. Comparativa de los valores medios de proporciones (%) a nivel de especie para cada grupo.

		SALUD/GINGIVITIS	PERIODONTITIS III/IV	p
Índice	Shannon	3,63	3,54	0,7335
	Chao1	179,80	170,55	0,9096
	ACE	179,81	170,63	0,9096
	Simpson	0,93	0,93	0,5128

Tabla 11. Comparativa de valores medios de los índices de diversidad alfa a nivel de especie, por cada grupo.

VII. Bibliografia

1. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S68-S77.
2. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S162-S170.
3. Heaton B, Dietrich T. Causal theory and the etiology of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2012;58(1):26-36.
4. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 1999;70(4):457-470.
5. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014;35(1):3-11.
6. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):481-490.
7. Chimenos-Küstner E, Giovannoni ML, Schemel-Suárez M. Dysbiosis as a determinant factor of systemic and oral pathology: importance of microbiome. *Med Clin (Barc)*. 2017;149(7):305-309.
8. Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet 'Omics - A genealogical treasury of words genealogical treasury of words. *The Scientist*. 2001;15(7):8.
9. Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 4:2-4.
10. Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016;221(10):657-666.
11. Bartold PM, Van Dyke TE. An appraisal of the role of specific bacteria in the initial pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2019;46(1):6-11.
12. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6(2):201-208.
13. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471-480.

14. Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease?. *J Clin Periodontol*. 2011;38 Suppl 11:7-16.
15. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 2001;11(1):3-11.
16. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-5467.
17. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of next-generation sequencing technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122(1):e59.
18. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(12):e1002808.
19. Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res*. 2009;19(7):1141-1152.
20. Lozupone CA, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(4):557-578.
21. Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand Stat Theory Appl*. 1984; 11(4):265-270.
22. Chao A, Ma MC, Yang MCK. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika*. 1993;80(1):193-201.
23. Heltshe JF, Forrester NE. Estimating species richness using the jackknife procedure. *Biometrics*. 1983;39(1):1-11.
24. Colwell RK, Coddington JA. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994;345(1311):101-118.
25. Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J*. 1948;27(3):379-423.
26. Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature*. 1949;163(4148):688.
27. Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr*. 1957;27(4):325-349.
28. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013;69(1):137-143.
29. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis*. 2017;23(3):276-286.
30. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010;192(19):5002-5017

31. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-193.
32. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol.* 2018;200(4):525-540.
33. Mason MR, Preshaw PM, Nagaraja HN, Dabdoub SM, Rahman A, Kumar PS. The subgingival microbiome of clinically healthy current and never smokers. *ISME J.* 2015;9(1):268-272.
34. Li J, Quinque D, Horz HP, Li M, Rzhetskaya M, Raff JA, et al. Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiol.* 2014;14:316.
35. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012;13(6):R42.
36. Chen H, Jiang W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Front Microbiol.* 2014;5:508.
37. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* 2010;4(8):962-974.
38. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-5732.
39. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):926-932.
40. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(10):717-725.
41. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol.* 1972;43(1):38.
42. Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. VII. Bleeding, suppuration and probing depth in sites with probing attachment loss. *J Clin Periodontol.* 1985;12(6):432-440.
43. Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol.* 1972;24(4):638-644.
44. Schulz S, Porsch M, Grosse I, Hoffmann K, Schaller HG, Reichert S. Comparison of the oral microbiome of patients with generalized aggressive periodontitis and periodontitis-free subjects. *Arch Oral Biol.* 2019;99:169-176.

45. Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(6):431-440.
46. Schloss PD. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput Biol.* 2010;6(7):e1000844.
47. Shi M, Wei Y, Hu W, Nie Y, Wu X, Lu R. The subgingival microbiome of periodontal pockets with different probing depths in chronic and aggressive periodontitis: A pilot study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:124.
48. Liu B, Faller LL, Klitgord N, Mazumdar V, Ghodsi M, Sommer DD, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS One.* 2012;7(6):e37919.
49. Deng ZL, Szafranski SP, Jarek M, Bhuju S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep.* 2017;7(1):3703.
50. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-187.
51. Ai D, Huang R, Wen J, Li C, Zhu J, Xia LC. Integrated metagenomic data analysis demonstrates that a loss of diversity in oral microbiota is associated with periodontitis. *BMC Genomics.* 2017;18(Suppl 1):1041.
52. Galimanas V, Hall MW, Singh N, Lynch MDJ, Goldberg M, Tenenbaum H, et al. Bacterial community composition of chronic periodontitis and novel oral sampling sites for detecting disease indicators. *Microbiome.* 2014;2:32.
53. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013;7(5):1016-1025.
54. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 2012;6(6):1176-1185.
55. Duran-Pinedo AE, Paster B, Teles R, Frias-Lopez J. Correlation network analysis applied to complex biofilm communities. *PLoS One.* 2011;6(12):e28438.
56. Duran-Pinedo AE, Frias-Lopez J. Beyond microbial community composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes Infect.* 2015;17(7):505-516.
57. Yamada R, Okada D, Wang J, Basak T, Koyama S. Interpretation of omics data analyses. *J Hum Genet.* 2020;10.1038/s10038-020-0763-5.

58. Jiang D, Armour CR, Hu C, Mei M, Tian C, Sharpton TJ, et al. Microbiome multi-omics network analysis: statistical considerations, limitations, and opportunities. *Front Genet.* 2019;10:995.